

活性氧检测试剂盒(含稀释液)

产品编号	产品名称	包装
S0034S	活性氧检测试剂盒(含稀释液)	>100次
S0034M	活性氧检测试剂盒(含稀释液)	>500次

产品简介:

- 碧云天的活性氧检测试剂盒(含稀释液) (Reactive Oxygen Species Assay Kit with Diluent, 也称ROS Assay Kit with Diluent), 是一种使用便捷、检测效果更有保障的提供了所需的稀释液, 并利用荧光探针DCFH-DA进行活性氧检测的试剂盒。
- DCFH-DA本身没有荧光, 可以自由穿过细胞膜, 进入细胞内后, 可以被细胞内的酯酶水解生成DCFH。而DCFH不能通透细胞膜, 从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的DCFH生成有荧光的DCF。检测DCF的荧光就可以知道细胞内活性氧的水平[1, 2]。
- 本试剂盒提供了活性氧阳性对照试剂Rosup, 以便于活性氧的检测。Rosup是一种混合物(compound mixture), 浓度为50mg/ml。使用本试剂盒检测细胞内活性氧的效果请参考图1。本试剂盒同时提供了经优化的探针稀释液和Rosup稀释液, 使用更便捷, 通常可以确保获得更稳定可靠的检测效果。

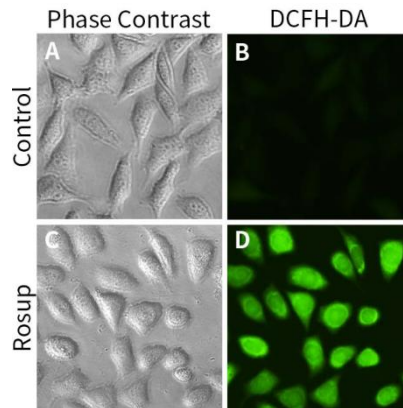


图1. 碧云天活性氧检测试剂盒(含稀释液) (S0034)检测L929 (小鼠成纤维细胞)细胞内活性氧的效果图。L929细胞使用本试剂盒装载DCFH-DA探针后用50 μ g/ml Rosup处理30分钟, 随后PBS洗涤一次后用荧光显微镜检测。正常的L929细胞中探针几乎未被氧化成荧光化合物, 细胞中的绿色荧光非常弱(图A, B); 使用活性氧阳性对照试剂Rosup处理使细胞内活性氧生成大幅增加, DCFH-DA与活性氧反应, 细胞中的绿色荧光显著增强(图C, D)。实际结果会因实验条件、检测仪器等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒本底低, 灵敏度高, 线性范围宽, 使用方便。
- 本试剂盒小包装和中包装, 6孔板每孔检测体系的体积为1ml时, 分别可以检测100次和500次; 96孔板每孔检测体系为100 μ l时, 分别可以检测1000次和5000次。如果用于流式细胞仪, 每个样品检测体系体积为0.5ml时, 分别可以检测200次和1000次。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
S0034S-1	DCFH-DA (10mM)	0.1ml
S0034S-2	探针稀释液	100ml
S0034S-3	活性氧阳性对照(Rosup, 50mg/ml)	0.1ml
S0034S-4	Rosup稀释液	100ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
S0034M-1	DCFH-DA (10mM)	0.5ml
S0034M-2	探针稀释液	500ml
S0034M-3	活性氧阳性对照(Rosup, 50mg/ml)	0.5ml
S0034M-4	Rosup稀释液	500ml

保存条件：

-20°C保存，一年有效。其中DCFH-DA (10mM)须避光保存。

注意事项：

- 探针装载后，一定要洗净残余的未进入细胞内的探针，否则会导致背景较高。
- 探针装载完毕并洗净残余探针后，可以进行激发波长的扫描和发射波长的扫描，以确认探针的装载情况是否良好。DCF的激发光谱和发射光谱请参考下页图谱。
- 尽量缩短探针装载后到测定所用的时间(刺激时间除外)，以减少各种可能的误差。
- 荧光酶标仪检测时须使用适合荧光检测的黑板或白板，推荐使用碧云天BeyoGold™全黑96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP966)或BeyoGold™黑色透明底96孔细胞培养板(平底带盖，独立包装)(FCP965)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 装载探针

对于刺激时间较短(通常为2小时以内)的细胞，先装载探针，后用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞。对于细胞刺激时间较长(通常为6小时以上)的细胞，先用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，后装载探针。

注：活性氧阳性对照(Rosup)推荐使用本试剂盒提供的Rosup稀释液进行稀释，以确保获得良好的诱导效果。对于目的药物，也可以酌情使用Rosup稀释液进行稀释，以获得良好的诱导效果。

原位装载探针：本方法仅适用于贴壁培养细胞。按照1:1000用探针稀释液稀释DCFH-DA，使终浓度为10微摩尔/升。去除细胞培养液，加入适当体积稀释好的DCFH-DA。加入的体积以能充分盖住细胞为宜，通常对于六孔板的一个孔加入稀释好的DCFH-DA不少于1毫升。37°C细胞培养箱内孵育20分钟。用细胞外液(C0216)或酌情使用PBS、HBSS、无血清细胞培养液等适当溶液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。通常活性氧阳性对照在刺激细胞20-30分钟后可以显著提高活性氧水平。

收集细胞后装载探针：按照1:1000用探针稀释液稀释DCFH-DA，使终浓度为10微摩尔/升。细胞收集后悬浮于稀释好的DCFH-DA中，细胞浓度为二百万至二千万/毫升，37°C细胞培养箱内孵育20分钟。每隔3-5分钟颠倒混匀一下，使探针和细胞充分接触。用细胞外液(C0216)或酌情使用PBS、HBSS、无血清细胞培养液等适当溶液洗涤细胞三次，以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。直接用活性氧阳性对照或自己感兴趣的药物刺激细胞，或把细胞等分成若干份后刺激细胞。通常活性氧阳性对照在刺激细胞20-30分钟后可以显著提高活性氧水平。细胞外液推荐使用细胞外液(Extracellular Solution) (C0216)，PBS推荐使用PBS (C0221A)，HBSS推荐使用Hanks' Balanced Salt Solution (C0218)。

说明：仅在阳性对照孔中加入Rosup作为阳性对照，其余孔不必加入Rosup。

2. 检测

对于原位装载探针的样品可以用激光共聚焦显微镜直接观察，或收集细胞后用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测。对于收集细胞后装载探针的样品可以用荧光分光光度计、荧光酶标仪或流式细胞仪检测，用激光共聚焦显微镜直接观察也可以。

3. 参数设置

使用488nm激发波长，525nm发射波长，实时或逐时间点检测刺激前后荧光的强弱。DCF的荧光光谱和FITC非常相似，可以用FITC的参数设置检测DCF。DCF的激发光谱和发射光谱参考图2。

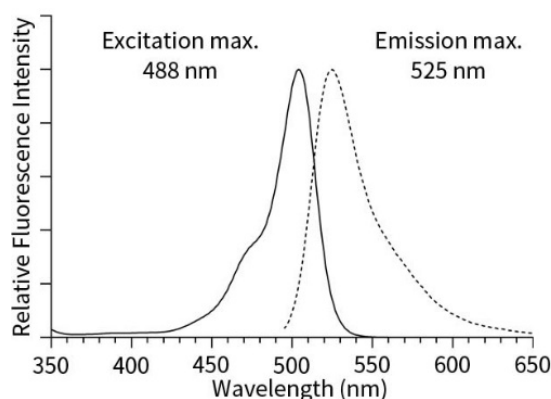


图2. DCF的激发光谱和发射光谱。

4. 其它说明

阳性对照Rosup可以按照1:1000的比例用Rosup稀释液稀释后使用。例如装载好探针的细胞，直接吸除液体或离心后吸除液体，加入适当体积的按照1:1000稀释的Rosup阳性对照刺激。通常刺激后20-30分钟内可以观察到非常显著的活性氧水平升高。对于不同的细胞，活性氧阳性对照(Rosup)的效果可能有较大的差别。如果在刺激后30分钟内观察不到活性氧的升高，可以适当提高活性氧阳性对照(Rosup)的浓度。如果活性氧升高得过快，可以适当降低活性氧阳性对照(Rosup)的浓度。对于特定的细胞，Rosup作用浓度和作用时间可能有所不同，需自行摸索最佳工作浓度和作用时间，甚至某些细胞可能对Rosup不敏感。

另外，对于某些细胞，如果发现没有刺激的阴性对照细胞荧光也比较强，可以按照1:2000-1:5000稀释DCFH-DA，使装载探针时DCFH-DA的浓度为2-5微摩尔/升。

探针装载的时间也可以根据情况在15-60分钟内适当进行调整。

活性氧阳性对照(Rosup)仅用于作为阳性对照的样品，并不是在每个样品中都需加入活性氧阳性对照(Rosup)。

参考文献：

1. Rastogi RP, Singh SP, Häder DP, Sinha RP. Biochem Biophys Res Commun. 2010. 397(3):603-7.
2. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. Free Radic Res. 2010. 44(6):587-604.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C2055	BODIPY 500/510 C1, C12(脂肪酸绿色荧光探针)	1mg/5mg/25mg
S0019	DAF-FM DA (NO荧光探针)	>100次/>500次
S0033	活性氧检测试剂盒	>100次/>500次
S0034	活性氧检测试剂盒(含稀释液)	>100次/>500次
S0035	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA)	20-200次/100-1000次
S0036	活性氧检测试剂盒(CM-H ₂ DCFDA, 含稀释液)	20-200次/100-1000次
S0038	过氧化氢检测试剂盒	150次
S0043	脂质过氧化检测试剂盒(BODIPY 581/591 C11)	100-1000次/500-5000次
S0051	过氧化氢酶检测试剂盒	100次
S0060	超氧化物检测试剂盒	100次
S0061	线粒体超氧化物检测试剂盒(MitoSOX Red)	20-200次/100-1000次
S0063	Dihydroethidium (超氧化物阴离子荧光探针)	5mg
S0064S	超氧阴离子活性氧检测试剂盒(DHE)	100-1000次
S0067-100µg	SOSG (单线态氧绿色荧光探针)	100µg
S0068S	单线态氧检测试剂盒(SOSG)	30-300次
S0131	脂质氧化(MDA)检测试剂盒	100次/500次

Version 2025.01.19